

Kísérletes tüdőmetasztázisok ereződésének vizsgálata

SZABÓ VANECSZA

Semmelweis Egyetem, Patológiai Tudományok Doktori Iskola, Budapest

Témavezető: DR. PAKU SÁNDOR, DSc

Levelezési cím:

Szabó Vanessza, Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, 1085 Budapest, Üllői út 26., e-mail: nesszy20@gmail.com

Közlésre érkezett:

2019. október 10.

Elfogadva:

2019. október 24.

Napjainkban is nagy kihívást jelent a tüdőáttétes betegek kezelése. A terápiák egy lehetséges célpontja a metasztázisok ereződésének gátlása. Különböző szöveti eredetű tumorok esetében vizsgáltuk a kísérletes tüdőmetasztázisok vaszkularizációjának lehetséges mechanizmusait. Kísérleteinkben hat tumorsejtvonal ereződését vizsgáltuk. A tumorok a meglévő alveoláris kapillárisok bekebelezésével tettek szert saját érhálózatra. Az érbekebelezés kezdeti szakaszában az inkorporált kapillárisok még rendelkeztek pneumocita-borítással. Öt tumorsejtvonal (B16, HT1080, HT25, C26 és MAT-B-III) migrációja során leválasztotta a pneumocitákat a kapillárisokról. A folyamat előrehaladtával a tumor belsejében található, erősen komprimált pneumociták degradálódtak, de a bekebelezett és lecsupaszított erek funkcionálisak maradtak. A nem invazív tumortípusnál (C38) a tumorsejtek desmoplasztikus reakciót váltottak ki az alveólusfalban, mely folyamat végeredménye a centrális érrel rendelkező kötőszövetes oszlopok kialakulása volt. Összegezve, adataink alapján mindegyik tumortípus az alveólusokban lévő kapillárisokat inkorporálta. *Magy Onkol* 64:73–75, 2020

Kulcsszavak: tüdőmetasztázis, ereződés, érbekebelezés, tumorsejt-migráció

Treatment of patients with lung metastases remains a major challenge. A possible target for therapies is the inhibition of vascularization of metastases. We examined the vascularisation process of lung metastasis in six different preclinical models and found that the tumours incorporated the pre-existing alveolar capillaries (i.e. vessel co-option). During the initial phase of vessel co-option, the incorporated capillaries were still sheathed by pneumocytes, but these incorporated vessels subsequently underwent different fates dependent on the model. In five of the models examined (B16, HT1080, HT25, C26 and MAT-B-III), the tumour cells gradually stripped the pneumocytes from the vessels. These dissected pneumocytes underwent fragmentation, but the incorporated microvessels survived. In the sixth model (C38), the tumour cells failed to invade the alveolar walls. Instead, they induced the development of vascularised desmoplastic tissue columns. In conclusion, our data show that lung metastases can vascularise by co-opting the pulmonary microvasculature.

*Szabó V. Mechanism of tumour vascularisation in experimental lung metastases. *Magy Onkol* 64:73–75, 2020*

Keywords: lung metastasis, vascularisation, vessel co-option, tumour cell migration

BEVEZETÉS

Az antiangiogén terápiák az endotélsejt-proliferáció gátlásán alapszanak, azonban gyakran hatástalanok. Mivel a különböző szövetek és szervek kötőszövetének és érhalózatának szerkezete eltérő, felmerül, hogy bennük a tumorok ereződése eltérően megy végbe. Olyan primer tumorok esetében (mellő, bél, bőr), melyek környezetében nagy mennyiségű kötőszövet található, az angiogenezisnek két fő formája figyelhető meg: a bimbózó és az intusszuszeptív angiogenezis. Mindkét folyamat alapvetően endotélsejt-proliferációval járó érdenzítés-növekedést jelent. A metasztázisképzés fő szerveiben (máj, agy és tüdő) azonban elsődlegesen nem található nagy mennyiségben kötőszövet, így az áttétek alternatív vaszkularizációs mechanizmusokkal (például érinkorporáció) tesznek szert vérellátásra.

CÉLKITŰZÉSEK

A primer tumorok és metasztázisok vaszkularizációjának számos módját írták le különböző szövetekben, szervekben, azonban a tüdőmetasztázisok ereződésének pontos mechanizmusa még a mai napig nem teljesen ismert. Ezért célkitűzéseink a következők voltak:

1. Kísérletes tüdőmetasztázisok vaszkularizációs mechanizmusainak meghatározása különböző szöveti eredetű tumorok esetében.
2. A kötőszövetes szerkezet kialakulásának vizsgálata különböző szöveti eredetű tumorvonalak invazív és nem invazív növekedési mintázatot mutató tüdőmetasztázisaiban.
3. C38 tumorok érinkorporációs mechanizmusának, kötőszövetes szerkezetének összehasonlítása tüdőmetasztázisokban és szubkután szövetben.
4. Kísérletes tüdőmetasztázisok vérellátása eredetének (bronhiális, pulmonális) meghatározása és ennek hatása a tumorsejtek proliferációjára.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálatainkban HT1080 humán fibroszarkóma, HT25 humán kolon-adenokarcinóma, A2058 humán melanóma, MAT-B-III patkány emlő-adenokarcinóma, B16 egér melanóma, valamint C26 és C38 egér kolon-adenokarcinóma sejtvonalakat használtunk. A tüdőmetasztázisokat öt tumorsejtvonal intravénás (farokvéna) oltásával hoztuk létre. A C38 egér kolon-adenokarcinóma esetében spontán metasztázismodell alkalmazva hoztuk létre a tüdőmetasztázisokat. A tüdőmetasztázisok vérellátásának vizsgálatához MAT-B-III modellt használtunk. Először a pulmonális artéria rendszerét töltöttük fel kék műgyantával. Ezután a bronhiális artéria rendszerét töltöttük fel piros műgyantával. A metasztázisok méretének meghatározásához a műgyantával feltöltött tüdőket eltávolítottuk, lebenyekre vágtuk. Meghatároztuk a felszínen lévő metasztázisok átmérőjét, majd a lebenyek korróziója után megállapítottuk az egyes metasztázisok vérellátását. A különböző lokalizációjú (tüdő, szubkután) tumorok fagyasztott metszetein immunfluoresz-

cens technikával CD31, αSMA, laminin, BrdU, kollagén I, podoplanin festést végeztünk. A mintákat konfokális lézer szkennig mikroszkóppal vizsgáltuk. Fagyasztott metszeten a metasztázisok ereiben lévő műgyanta színe alapján meghatároztuk a bronhiális vagy pulmonális eredetet, majd anti-BrdU festéssel az osztódó tumorsejtek arányát. A2058 és MAT-B-III sejtek proliferációs képességét Alamar Blue tesztel vizsgáltuk *in vitro* hipoxiás (1% O₂) és normoxiás (21% O₂) körülmények között. A C38, B16 és HT1080 tumort hordozó egereket 2%-os glutáraldehid tartalmú Na-kakodilát pufferrel perfundáltuk a bal kamrán keresztül. A tumort tartalmazó szövetek (tüdő, szubkután szövet) 1-2 mm³-es darabjait glutáraldehiddel és 1% OsO₄-dal fixáltuk. Kontrasztolás után Philips CM10 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk a mintákat.

EREDMÉNYEK

A vaszkularizáció folyamatát hat különböző kísérletes tüdőmetasztázis-modellben vizsgáltuk. A metasztázisok növekedésük első fázisában úgy tesznek szert az érrendszerükre, hogy bekebelezik a meglévő alveólusokat és ezzel együtt az alveólusok falában elhelyezkedő kapillárisokat. A tumorok terjedésének alapvető módja minden tumorvonal esetében a tumorszövet alveólusról alveólusra történő „áramlása” volt. Az inkorporált kapillárisok lumenjében tumorsejtek nem találhatók, a tumorsejtek és a pneumociták plazmamembránjai szoros kapcsolatban vannak. A tumorsejtek (kivéve a C38 kolorektális adenokarcinómát) migrációjuk során leválasztották a pneumocitákat a kapillárisokról úgy, hogy az azok között található kettős bazális membránt szétválasztották. A folyamat előrehaladtával a tumor belsejében található komprimált pneumociták degradálódtak, de a bekebelezett és lecsupaszított erek funkcionálisak maradtak, így képesek maradtak a metasztázis vérellátását biztosítani. A pneumocitamentes erek létrejöttét maguk a tumorsejtek indukálják úgy, hogy a tumormasszával kitöltött alveólusok lumenéből a tumorsejtek visszalépnek az alveólusok falában található kötőszövetes állományba, majd betörnek a kapillárisok és az alveólusepitélium közé azokon a területeken, ahol a pneumocitákat és az endotélsejteket csak a kettős bazális membrán választja el egymástól (vér-levegő gát). Ennek eredményeként a pneumociták leválnak a kapillárisokról. A folyamat végeredményeképpen a tumorsejtek teljesen körbeveszik a kapillárisokat.

A C38 tumor a többi tumormodelltől eltérő módon lép kapcsolatba a tüdőszövettel, így ereződése is eltérő módon zajlik. Az alveoláris tereken keresztül terjedő tumorsejtek nem lépnek vissza az alveólusok interstíciumába, és így nem választják le a pneumocitákat az alveólusok kapillárisairól, ehelyett dezmozplasztikus reakciót váltanak ki az alveólusok falában. Ennek eredményeként a C38-metasztázisokban az alveólusfalak kötőszövetes oszlopokká alakulnak. Az oszlopok kollagéntartalmú mátrixba ágyazott, bazális membránnal körülvevett centrális érből, αSMA-pozitív, aktivált fibroblasz-

tokból és a mindezt körülvevő (a tumor által termelt) bazális membránból állnak.

Az α SMA-pozitív miofibroblasztok, a kötőszövetes kollagén mennyisége és eloszlása a vizsgált kísérletes tumorokban eltéréseket mutatott. Az alveólusfalak inváziója során minden tumortípus esetében az ott található fibroblasztok miofibroblasztá alakultak. A metasztázisok az alveólusok kapillárisaival együtt bekebeleztek az alveólusok falában elhelyezkedő, α SMA-pozitív miofibroblasztokat, azonban a metasztázisok körül nem volt megfigyelhető dezmozplasztikus reakció (fibroblasztaktiválás, kollagéntermelés és -depozíció).

A B16 melanóma és a HT1080 fibroszarkóma esetében az α SMA-pozitív sejtek száma nem növekedett a tumor centruma felé, a bekebelezett erek körül csak kis mennyiségű kollagénlerakódás volt megfigyelhető. Ezzel ellentétben az aktivált fibroblasztok száma és a kollagén mennyisége nőtt a peritumorális tüdőszövetből a tumor centruma felé a MAT-B-III, C26 és különösképp a HT25 kolon-adenokarcinóma metasztázisok esetében.

Mivel a tüdő kettős vérellátással rendelkezik, megvizsgáltuk a tüdőmetasztázisok vérellátásának eredetét. Különböző méretű MAT-B-III patkány emlő-adenokarcinóma tüdőmetasztázisokban a vérellátás eredetét vizsgálva azt találtuk, hogy az 5 mm-nél nagyobb átmérőjű metasztázisok 95%-a artériás vérellátású (bronhiális artérián keresztül), a 3 mm-nél kisebb metasztázisok 97%-a pedig vénás vérellátású (pulmonális artérián keresztül).

A különböző vérellátású metasztázisok tumorsejtjeinek proliferációs rátáját is összehasonlítottuk. A bronhiális vérellátású metasztázisok tumorsejtjeinek proliferációs indexe szignifikánsan magasabb volt, mint a pulmonális vérellátásúaké ($43,5 \pm 6,1\%$ vs. $35,3 \pm 2,5\%$; átlag $\pm$ szórás; $p < 0,05$).

In vitro kísérletekben is igazoltuk, hogy a magasabb oxigénkoncentrációban szignifikánsan nagyobb a tumorsejtek proliferációs rátája.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A tumorok terjedésének alapvető módja minden vizsgált tumorvonal esetében a tumorszövet alveólusról alveólusra történő „áramlása” volt. Ennek eredményeként mindegyik tumortípus az alveólusokban lévő kapillárisokat inkorporálta aktív peritumorális érképződés nélkül.

2. Az inkorporációt követően az invazív tumorok infiltrálják az alveólusfalat, és leválasztják a pneumocitákat a kapillárisokról. A folyamat során a tumorsejtek az alveólusfal bazális membránját egy epiteliális és egy endoteliális rétegre választják szét. Ugyanakkor a lecsupaszított erek funkcionálisak maradnak.

3. A nem invazív C38 tumorvonal dezmozplasztikus reakciót vált ki az alveólusfalban, melynek következményeként centrális érrel rendelkező, a tumorszövet vérellátását biztosító, kötőszövetes oszlopok alakulnak ki a metasztázisban.

4. Tüdőben és szubkután szövetben növekvő C38 tumorok széli részein fibroblasztaktiváció (miofibroblaszt) és kollagén-depozíció zajlik. Megállapíthatjuk tehát, hogy minden olyan lokalizációban létrejönnek a jellegzetes, a vérellátást biztosító struktúrák, ahol a tumornövekedés korai stádiumában jelen vannak fibroblasztok a tumor környezetében.

5. Patkánytüdőben a metasztázisok 5 mm felett bronhiális artéria eredetű vérellátásra tesznek szert. A magasabb oxigénkoncentráció, ami a tüdőben a bronhiális artéria által ellátott metasztázisokban található, a tumorsejtek számára növekedési előnyt biztosít, melyet *in vitro* kísérletekben is igazoltunk.

A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

1. Szabo V, Bugyik E, Dezső K, et al. Mechanism of tumour vascularization in experimental lung metastases. *J Pathol* 235:384–396, 2015
2. Bugyik E, Renyi-Vamos F, Szabo V, et al. Mechanisms of vascularization in murine models of primary and metastatic tumor growth. *Chin J Cancer* 35:19, 2016

3. Szabo V, Bugyik E, Dezső K, et al. Tumorsejt-invázió/migráció szerepe kísérletes tüdőmetasztázisok ereződésében. *Magy Onkol* 59:319–323, 2015
4. Bugyik E, Szabo V, Dezső K, et al. Role of (myo)fibroblasts in the development of vascular and connective tissue structure of the C38 colorectal cancer in mice. *Cancer Commun* 38:46, 2018